

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1  
com a apoptose de células monucleares de sangue  
periférico e leucócitos de baço de cães com  
leishmaniose visceral**

**Aline Aparecida Correa Leal**

Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP  
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1  
com a apoptose de células monucleares de sangue  
periférico e leucócitos de baço de cães com  
leishmaniose visceral**

**Aline Aparecida Correa Leal**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP  
2016

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Leal, Aline Aparecida Correa

L473i

Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com a apoptose de células mononucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral / Aline Aparecida Correa Leal.

Araçatuba: [s.n.], 2016.  
48f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Adjunto: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cães. 2. Leishmania infantum. 3. Zoonoses I. T.

CDD 616.9364

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com apoptose de células mononucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral

AUTORA: **ALINE APARECIDA CORREA LEAL**

ORIENTADORA: **VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Profa. Dra. MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP

Araçatuba, 06 de maio de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Aline Aparecida Correa Leal** - nascida em 10 de setembro de 1984, na cidade de Promissão/SP, graduada em Medicina veterinária no ano de 2011 pela Universidade Estadual Paulista - UNESP – Araçatuba-SP. Realizou especialização no ano de 2012 na mesma universidade, através da residência em Diagnóstico Veterinário com ênfase em laboratório clínico veterinário. No ano de 2013 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, como aluna especial do programa de mestrado, passando a aluna regular em 2014. Em 26 de julho de 2015 integralizou os créditos e em 05 de fevereiro de 2016 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação, com o trabalho intitulado “Produção de ROS e NO na Leishmaniose canina e sua relação com a apoptose celular”.

## EPÍGRAFE

***“Sonhar grande ou sonhar pequeno custam o mesmo preço.”***

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Célio e Edna, que me apoiaram em todos os momentos da minha caminhada acadêmica.*

*Ao meu marido Vinicius, que por muitas vezes acreditou mais em mim do que eu mesma.*

*Aos meus amigos, os quais muitas vezes foram meu braço direito e fizeram desta etapa mais alegre e tranquila.*

*Aos animais, sem os quais não seria capaz de realizar nossos experimentos e sem os quais não saberia para que estudar.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Valéria Marçal Félix de Lima que aceitou passar esses dois anos e meios ao meu lado, orientando-me de forma a proporcionar tanto meu crescimento científico como o desenvolvimento pessoal.

A minha família, por ser meu alicerce em momentos difíceis e meus companheiros nos momentos de alegria.

Aos meus grandes amigos Breno Almeida, Kathlenn Silva, Juliana Perosso e Vanessa Chiku, que sempre estiveram ao meu lado no laboratório, ajudando tanto no desenvolvimento do projeto como no companheirismo nos dias mais difíceis. Aos meus amigos Gabriela Venturin, Flavia Yamamoto, Larissa Melo e Alex Nakamura pelo companheirismo e pelos momentos de apoio.

À direção da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, à chefia do DCCRA e a todos os funcionários da unidade.

À minha banca de qualificação Profa. e orientadora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Profa. Dra. Flavia Lopes e Profa. Dra. Juliana Peiró pelas relevantes considerações sobre o meu trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa (2013/06684-9), à CAPES e a FAPESP (2014/08931-6) por conceder a bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	11
CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
OBJETIVOS.....	20
REFERÊNCIAS .....	21
CAPÍTULO 2.....	26
Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com a apoptose de células monucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral .....	27
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
2.1 Seleção dos Animais .....	33
2.2 Isolamento, cultura, marcação e determinação das taxas de ROS, NO e apoptose .....	33
2.3 Produção de NO e ROS por PBMC de células de cães controle e infectados.....	34
2.4 Atividade da enzima HO-1 em células monucleares sanguíneas e leucócitos de baço.....	35
2.5 Análise estatística. ....	35
3 RESULTADOS.....	36
4 DISCUSSÃO.....	39
AGRADECIMENTOS.....	44
REFERÊNCIAS .....	44

## **Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com apoptose de células mononucleares de sangue periférico e baço de cães com leishmaniose visceral**

**RESUMO** - Leishmania são protozoários intracelulares obrigatórios que infectam células fagocitárias de mamíferos ocasionando a leishmaniose visceral canina (LVC). Por apresentarem um intenso parasitismo cutâneo, os cães infectados possuem papel chave na transmissão da doença. Para sobreviver no hospedeiro, as leishmanias são capazes de desenvolver mecanismos de escape por alterações das respostas de células fagocitárias, tais como o NO e o ROS responsáveis pela morte intracelular do parasita. A HO-1 também pode estar envolvida na regulação da resposta imune, porém seu papel na leishmaniose visceral canina ainda não está claro. A produção excessiva de NO, ROS e HO-1 pode ser prejudicial e estar relacionada com a apoptose e desregulação imunológica na LVC. Assim o este estudo teve a finalidade de investigar os níveis de ROS, NO e atividade HO-1 em células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço e sua correlação com a apoptose celular. Para isso foram utilizadas células mononucleares sanguíneas e leucócitos de baço de cães infectados e saudáveis. As células foram isoladas e cultivadas durante 24 horas, na sequência foram incubadas com sondas para NO ou ROS e foi determinada a apoptose celular. Todas as análises foram realizadas por citometria de fluxo. Após a lise das células em cultura, a atividade HO-1 foi determinada no lisado celular por método colorimétrico. O metabolismo oxidativo estava reduzido e a taxa de apoptose dos mononucleares sanguíneos aumentada, por influência do ROS. Os níveis de ROS e NO estavam diminuídos nos leucócitos do baço de cães infectados, e maior taxa de apoptose celular foi observada nos leucócitos de baço de cães infectados. A atividade da HO-1 obtida estava reduzida tanto nos mononucleares do sangue como nos leucócitos do baço dos animais infectados, quando comparados aos animais saudáveis, porém não mostrou correlação com a

apoptose. Concluímos que os mecanismos indutores de apoptose diferem nos sítios de infecção, ou seja, no baço os reativos de oxigênio e de nitrogênio estão envolvidos com a inibição do processo de morte celular, no entanto a atividade de hemooxigenase pode ter influência na apoptose.

**Palavras chave:** Cães, *Leishmania infantum*, Zoonoses.

## **Interactions between the levels of NO, ROS and HO-1 activity and apoptosis monucleares cells from peripheral blood and spleen of dogs with visceral leishmaniasis**

**SUMMARY** - Leishmania are obligate intracellular protozoan that infects phagocytic mammalian cells causing canine visceral leishmaniasis (CVL). Because they have an intense cutaneous parasitism, infected dogs have key role in disease transmission. To survive in the host, the Leishmania are able to develop escape mechanisms by changes in phagocytic cell responses, such as the NO and the ROS responsible for the death of intracellular parasites. The HO-1 may also be involved in regulating the immune response, but their role in canine visceral leishmaniasis is not yet clear. The excessive production of NO, ROS and HO-1 can be detrimental and to be related to immune dysregulation and apoptosis in LVC. So this study aimed to investigate the levels of ROS, NO and HO-1 activity in mononuclear cells of peripheral blood leukocytes and spleen and its correlation with cell apoptosis. For this they used blood mononuclear cells and spleen leukocytes from infected and healthy dogs. Cells were isolated and cultured for 24 hours following probes were incubated with NO or ROS and cell apoptosis was determined. All analyzes were performed by flow cytometry. After lysis of the cells in culture, HO-1 activity in cell lysate was determined by a colorimetric method. Oxidative metabolism was reduced and the apoptosis rate of increased blood mononuclear, influenced by ROS. The levels of ROS and NO were decreased in leukocytes from the spleen of infected dogs, and increased apoptotic rate was observed in spleen leukocytes from infected dogs. The activity of HO-1 was obtained in both reduced blood monucleares as in the splenic leukocytes from infected animals compared with healthy animals, but was not correlated with apoptosis. We concluded that the apoptosis-inducing mechanisms differ at sites of infection, or spleen reactive

oxygen and nitrogen are involved with the inhibition of cell death, however hemooxygenase activity may play a role in apoptosis.

**Keywords:** Dogs, *Leishmania infantum*, Zoonoses

# **CAPÍTULO 1**

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são doenças causadas por cerca de 20 espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Esses parasitas já foram descritos em cerca de 98 países, colocando em risco cerca de 350 milhões de pessoas (DEJAUX, 2004; WHO, 2010). Nesses países existe a predominância da forma visceral da doença, que é a mais severa das leishmanioses, podendo ser fatal quando não tratada adequadamente (MURREY, 2002).

Endêmica no Brasil, a leishmaniose visceral (LV) tem sua maior incidência na região nordeste com 92% do total de casos, seguida pelas regiões sudeste (4%), norte (3%) e centro-oeste (1%) (OMS, 1990). No Brasil, como outros países da América do Sul, a migração para as áreas urbanas contribuiu para a expansão da LV (DESJEUX, 2004). No estado de São Paulo, o primeiro relato de leishmaniose visceral canina (LVC) ocorreu em 1998, na cidade de Araçatuba (GALIMBERTTI et al., 1999).

Embora existam diferentes espécies de *Leishmania*, o ciclo de vida desses protozoários é similar, sendo todos heteroxenos, ou seja, necessitam de diferentes hospedeiros para completar seu ciclo. Assim, esses protozoários se apresentam em duas formas distintas, sendo a forma amastigota encontrada no interior de células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, tais como o homem e os cães, e a forma flagelada promastigota, encontrada no tubo digestivo do flebotomíneos (FOREYT, 2005). O envolvimento de outros vetores tem sido relatado, tais como pulgas (FERREIRA et al., 2009) e carrapatos (COUTINHO; LINARD 2007), bem como a contaminação do hospedeiro através de transfusões de sangue.

Após a inoculação cutânea pelo vetor, os parasitas rapidamente difundem-se para os linfonodos e baço através da linfa e sangue, podendo atingir rins, fígado, órgãos reprodutores, sistema digestivo e respiratório, bexiga (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) onde causa lesões e sinais clínicos que são característicos da LV. Os cães infectados podem ser sintomáticos,

oligosintomáticos ou assintomáticos (ALVAR, et al., 2004) e alguns podem evoluir para a cura espontânea (FISA, et al., 1999). Os animais infectados também podem ser classificados em quatro estágios de infecção, conforme a apresentação clínica da doença (SOLANO-GALLEGO, 2009).

A forma assintomática representa 20 a 40% da população de cães soropositivos, dos quais 80% desenvolvem os sinais clínicos tardiamente (NOLI, 1999). No Brasil, em áreas urbanas da região nordeste, a forma assintomática representa 30% da população soropositiva (QUEIROZ, et al., 2009). Os sinais mais frequentes de LVC são linfadenopatia, onicogrifose, perda de peso, caquexia e anormalidades locomotoras (SEMIÃO-SANTOS et al., 1995), e os achados laboratoriais como a hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia (LANGONI et al., 2005). Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal (ALVAR et al., 2004).

No ambiente silvestre os principais reservatórios são mamíferos, especialmente roedores, xenartras, carnívoros, primatas e marsupiais (GRIMALDI, TESH, 1993). Contudo, fora desse ambiente os cães são os principais reservatórios desempenhando assim função fundamental na manutenção do ciclo epidemiológico da doença, sendo infectados antes que o homem. A prevalência da leishmaniose em cães de áreas endêmicas pode atingir 40% da população (SLAPPENDEL; FERRER, 1990), sendo mais prevalente que em humanos. Devido a presença de maior quantidade de parasitos na pele canina, existe a possibilidade de maior infecção do vetor (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

A resistência à infecção na LVC está associada aos baixos níveis de anticorpos específicos e a existência de imunidade celular, da qual fazem parte as linfócitos T CD4+ (Th1), que ativam de macrófagos (PINELLI et al., 1994). A ativação dos linfócitos T CD4+ (Th2) pelo parasita resulta no aumento da sua sobrevivência e no aparecimento das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas sobre os macrófagos (BARBIÉRI, 2006). Os linfócitos T CD8+ também parecem estar envolvidas com a infecção, estando presentes em

maior número após o tratamento da doença (BARBIÉRI, 2006). Pinelli et al. (1999) observaram que essas células são capazes de lisar macrófagos canino infectados por *L. infantum* e produzir IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos, estimulando assim o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o óxido nítrico (NO), responsáveis pela morte intracelular do parasita (PANARO et al., 2008).

Além da imunossupressão observada na LVC, o estresse oxidativo tem se destacado como uma das desordens orgânicas observadas em cães sintomáticos (BILDIK et al., 2004), o qual também pode estar relacionado a um possível efeito imunossupressor na imunidade inata (ALMEIDA et al., 2013; ALMEIDA, 2013).

Por replicar e viver obrigatoriamente nos macrófagos, a sobrevivência da *Leishmania* spp. Nestas células depende da ação de duas enzimas induzíveis, a óxido nítrico sintase induzível 2 e arginase 1 (NADERER, 2008). O IFN-gama, induz ativação clássica de macrófagos e expressão de iNOS, que oxida a arginina em duas etapas levando a produção de NO, o metabólito responsável pela morte do parasita. Além do papel microbicida do NO *in vitro*, já evidenciado na LVC (PINELLI et al., 2000). Ele também pode estar envolvido na imunopatologia da doença, pois em diferentes parasitoses sua produção excessiva está associada com a ausência de resposta linfocitária (BOGDAN, 2001).

As diferentes concentrações de óxido nítrico podem inibir ou estimular a taxa de apoptose celular (THOMAS et al., 2008; WINK et al., 2008), como já demonstrado em diferentes tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (BOGDAN, 2001). Wink et al. (2003), observaram que em baixas concentrações o NO promove a sobrevivência e a replicação celular, além de diminuir a taxa de apoptose, enquanto que em altas concentrações ele promove a parada do ciclo da célula causando danos ao DNA ocasionando a apoptose.

Recentemente tem sido demonstrado que o parasita e seus antígenos inibem a expressão de co-estimuladores estimulatórios e diminuem a produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012). Contudo, a ação de co-estimuladores

inibitórios podem induzir a apoptose ou mesmo outras vias importantes para a manutenção do organismo, quanto a resposta imune a doença (CHIKU et al., 2016).

O NO está intimamente ligado a atividade leishmanicida nos cães (PANARO et al., 1998; PANARO et al., 2001; PINELLI et al., 2000), quando foi inibida a produção de NO ocorreu menor atividade leishmanicida nos macrófagos (PINELLI, 2000).

Em cultura celular o NO, que é gasoso, rapidamente é convertido a nitrito e nitrato. Estudos anteriores somente avaliaram NO medindo o nitrito, utilizando o método de Griess (GUEVARA et al., 1998). Contudo, para a aferição desse metabólito é imprescindível um método preciso e confiável, pois suas características, tais como a meia vida curta, podem interferir na análise (EMBOLA et al., 2002). O uso de sondas (*probes*) intracelulares faz com que seja realmente analisado o NO, sem interferências de outras moléculas biologicamente semelhantes ou quando as concentrações de NO são muito pequenas (MURPHY et al., 2011).

Neutrófilos, monócitos e macrófagos podem controlar parasitas por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas durante a fagocitose em um processo chamado de explosão respiratória (RB), parte essencial da resposta imunológica inata (BRÜNE, 2013)

Vários estudos indicam que macrófagos murinos matam as promastigotas *in vitro*, pela produção de ROS (GANTT et al., 2001). Além disso, ratos deficientes na produção de ROS tiveram o aumento da susceptibilidade à doença, quando infectados com *Leishmania donovani*. Contudo parasitas, tais como, as leishmanias podem inibir essa resposta imune e evadir-se das técnicas de defesa do hospedeiro, como a explosão respiratória (COOMBS, 1989; PHAM et al., 2005). Em cães infectados com *L. infantum* já foi comprovado que esses mecanismos de defesa podem estar alterados (HEIDARPOUR et al., 2012). O estresse oxidativo tem grande importância na infecção por *L. infantum*, pois quanto maior sua taxa, maiores

serão os sinais que o animal apresenta (BILDIK et al., 2004; BRITTI et al., 2008).

Outro processo associado à regulação da resposta imunológica na LV é a apoptose (DAS et al., 1999), que pode influenciar ou não o desenvolvimento da doença (ALEXANDER et al., 2001). Em cães com leishmaniose, a apoptose das células T pode estar ligada à supressão da imunidade celular (LIMA et al., 2012) e conseqüentemente à progressão da doença. Cães infectados com *Leishmania infantum* apresentam redução no número de linfócitos T CD4+ e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos, seguida da disseminação do parasita para vários órgãos (BOURDOISEAU et al., 1997). Segundo Alvar et al.(2004), existe uma correlação direta entre os níveis das células T CD4+ e a resposta celular ao parasito, sendo a recuperação do animal doente após o tratamento acompanhada pelo aumento da porcentagem destas células.

Como mecanismo de defesa, a apoptose também pode causar inflamação durante as infecções parasitárias gerando sinais clínicos característicos da doença. Contudo, isso depende do estímulo ou receptores envolvidos na fagocitose de células necróticas ou apoptóticas que geraram sinais anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios, que causam a ativação de macrófagos (VERÇOSA et al., 2012). Cães com sintomas de LV apresentam uma reação inflamatória severa com altos índices de apoptose nas lesões de pele, podendo essas ter algum tipo de contribuição para a persistência da *Leishmania* spp. no sítio inflamatório (VERÇOSA et al., 2012).

A supressão imunológica observada em cães naturalmente infectados com *L. infantum* pode estar relacionada com o mecanismo de apoptose de linfócitos T. Lima et al. (2012) relataram um aumento da taxa de apoptose em linfócitos T no baço e no sangue periférico de cães infectados, enquanto Silva et al. (2013) mostraram que na infecção canina mFAS e mFASL estão envolvidos na apoptose dos linfocitos T destes mesmos tecidos. Ainda segundo Perosso et al. (2014), sFAS pode atuar conjuntamente com as moléculas de

mFAS e mFASL ativando o sistema apoptótico diminuindo a quantidade de células T.

Outro receptor que pode atuar na apoptose dos linfócitos T são os receptores PD1 e seus ligantes, que além de serem reguladores negativos da linfoproliferação podem também ativar a apoptose destas células (CHIKU et al, 2016).

Sabe-se também que o metabolismo oxidativo está aumentado em células mononucleares (MELO et al., 2014) e neutrófilos (ALMEIDA et al., 2013) de sangue periférico de cães com LV, sendo que a produção intermitente de reativos de oxigênio leva a lesão da membrana celular e conseqüentemente inicia a apoptose destas células (ZAMZAMI et al., 1996).

Na LV, além da apoptose a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) parece atuar nos mecanismos efetores envolvido com a imunidade. Em modelos experimentais indutores desta enzima aumentaram a carga parasitária em macrófagos peritoneais. E em humanos com LV altos níveis da enzima HO-1 foram detectados no soro (LUZ et al., 2012). A enzima HO-1, codificada pelo gene *Hmox1*, tem ganhado destaque devido aos seus efeitos imunoregulatórios, inibindo a proliferação e/ou função de células T, sendo sua expressão aumentada sob condições de estresse (SOARES et al., 2009).

A HO-1 atua inibindo o efeito pró-oxidante do heme livre no organismo, o qual pode ser prejudicial às células e tecidos por induzir o estresse oxidativo, citotoxicidade e inflamação (FERREIRA et al., 2008). Assim, após a quebra do complexo hemoglobina-haptoglobina, o grupo heme é quebrado pela HO-1 em ferro instável (Fe), biliverdina e monóxido de carbono (CO) (TENHUNEN et al., 1969).

A ação da enzima contra o estresse oxidativo parece estar ligada ao efeito citoprotetor que ela exerce e aos seus metabólitos que têm grande capacidade antioxidante: o Fe induz a produção de ferritina (BALLA et al., 1992); a biliverdina é rapidamente convertida em bilirrubina que possui efeito citoprotetor (STOCKER et al., 1987); e o CO também é citoprotetor (BROUARD et al., 2000) além de anti-inflamatório (OTTERBEIN et al., 2003).

Apesar disso, o papel da HO-1 ainda não está estabelecido na LVC. Em humanos, a presença de altas concentrações HO-1 parece estar associada com a presença da doença (LUZ et al., 2012). Luz et al. (2012), afirmaram em seu estudo que a presença de promastigotas estimula a produção de HO-1 em macrófagos murinos. Pham et al. (2005) sugerem que a presença de amastigotas e promastigotas regulam os níveis de HO-1, sendo a presença das amastigotas um estímulo mais rápido. Trabalhos recentes tem evidenciado que a enzima HO-1 pode controlar a produção de NO e inibir o processo apoptótico (MORSE, 2002). Chung e colaboradores sugerem que o NO induz a HO-1. A indução de HO-1 pelo óxido nítrico protege células T da apoptose induzida via FAS, e essa via pode ainda exercer um papel anti-inflamatório (CHUNG et al., 2008).

Embora algumas moléculas indutoras de apoptose estejam esclarecidas é possível que outros metabolitos possam contribuir na indução de apoptose, como já dito anteriormente, o óxido nítrico quando excessivamente produzido pode induzir apoptose. Em cães sintomáticos com LV, alta produção de iNOS foi observada no baço, porém nenhum estudo foi realizado para avaliar se a produção de NO tem correlação com a apoptose já documentada no baço e sangue periférico.

Esses conhecimentos poderão ser úteis para o entendimento da imunopatologia na LVC, e poderão originar futuras terapias baseado em drogas antiapoptóticas.

## **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi investigar a participação dos níveis de reativos de oxigênio, nitrogênio e da atividade da heme oxigenase em células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço na apoptose.

## REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALMEIDA, B. F. M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 163, n. 1-2, p. 6-12, 2013.
- ALMEIDA, B. F. M. D. **Estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina**. 2013. 75 f. (Dissertação de Mestrado - Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. 2013.
- ALEXANDER, C. E.; KAYE, P. M.; ENGWERDA, C. R. CD-95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1199-1210, 2001.
- BALLA, G. et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 25, p. 18148-53, 1992.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v.28, p.329-337, 2006.
- BILDIK, A. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v. 77, n. 1, p. 63-66, 2004.
- BOGDAN, C Nitric oxide and the immune response. **Nature**, v.2, p. 907-916, 2001
- BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 345-35, 1997.
- BRITTI, D. et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Vet. Res. Commun.**, v.32 p. 251–254, 2008.
- BRÜNE, B. et al. Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxid. Redox Signal**, v. 19, p. 595–637, 2013.
- CHIKU, V. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**. 2016
- CHUNG, S. W. et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. **J. Clin. Invest.**, v.118, p.239–247, 2008.

- COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet Parasitol**, v. 147, n. 3-4, p. 320-325, 2007.
- DAS, G. et al. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, v. 49, p. 307-10, 1999.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. **Comp Immunol. Microbiol. Infect Dis.**, v. 27, p. 305–318, 2004.
- DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Vet. Parasitol**, v. 189, n. 2-4, p. 137-44, 2012.
- EMBOLA, C. W. et al. Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UDP-GT1) gene complex by green tea in male F344 rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, p.841– 844, 2002.
- FERREIRA, A. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 86, n. 10, p. 1097-1111, 2008.
- FERREIRA, M. G. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.
- FISA, R. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, n. 2, p. 87-97, 1999.
- FOREYT, W.J. Parasitologia Veterinária. Tradução da 5ª edição. Editora Roca. 2005.
- GALIMBERTTI, M. Z. et al. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 217-218, 1999.
- GANTT, K. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, n.167, p.893–901, 2001.
- GUEVARA, I. et al. Determination of nitrite / nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clín. Chim. Acta.** v. 274, p.177–188,1998.
- HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J.; Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney

- variables, trace elements, and clinical status. **Parasitol. Res.** n. 111, p.1491–1496, 2012.
- LANGONI, H. et al. American visceral leishmaniasis: a case report. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 11, p. 361-372, 2005.
- LIMA, V. M. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 2-4, p. 147-53, 2012.
- LUZ, N. F. et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J. Immunol.**, v. 188, n. 9, p. 4460-7, 2012.
- MALLINSON, D.; COOMBS, G.; Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. **Int. J. Parasitol**; n.19, p.647–56,1989.
- MELO, L.M. et al. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **International Immunopharmacology** v.18. p.373–378. 2014.
- MOSSER D. M., EDWARDS J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews. Immun.** n.8, p. 958–969. 2008.
- MURRAY, H.W.; NATHAN, C.F.; Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of experimental medicine** n.189, p.741–746. 1999.
- MURPHY, M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell. Metab.** n.13, p.361–364, 2011.
- NADERER T, M. M. J. The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cell. Microbiol.** n.10, p.301–308, 2008.
- NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Walt. Focus**, v.2, p.16-24, 1999.
- OMS. **The leishmaniasis. technical report series.** Geneva: OMS, n. 701, 1990.
- OTTERBEIN, L. E. et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends Immunol**, v. 24, n. 8, p. 449-55, 2003.

- OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 219, n. 8, p. 1076-83, 2001.
- PANARO, M. A. et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? **Parasit. Vectors**, v. 1, p. 1-10. 2008.
- PANARO, M. A. et al. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin. Exp. Med.**, v. 1, p. 137-143. 2001.
- PANARO, M. A. et al. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 20, n.1, p. 147–158, 1998.
- PEROSSO, J. et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. **Vet. Paras.** n.205, p. 417–423. 2014.
- PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 12, p. 8322-33, 2005.
- PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol**, n.92, p.181-189. 2000.
- PINELLI, E. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum* infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 1, p. 237-243, 1999.
- QUEIROZ, P. V. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Res. Vet. Sci.**, v. 86, n. 2, p. 267-73, 2009.
- SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. D. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clín. Vet.**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SEMIÃO-SANTOS, S. J. et al. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitol. Res.**, v. 81, n. 3, p. 235-9, 1995.

- SILVA, K. L. et al CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.** n.197, p.470-476, 2013.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. **Leishmaniasis.** Philadelphia: WB Saunders, p.450-458.1990.
- SOARES, M. P.; BACH, F. H.; Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. **Trends Mol. Med.**, v.15, n. 2, p. 50-58, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- STOCKER, R. et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science**, v. 235, n. 4792, p. 1043-1046, 1987.
- TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 23, p. 6388-6394, 1969.
- THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, n.45, p.18–31. 2008.
- VERÇOSA, B. L. A. et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.**, v. 189, p. 162-170, 2012.
- WINK, D. A. et al. The reemergence of nitric oxide and cancer. **Nitric Oxide.** n.19, p.65–7. 2008.
- WINK D. A.; MITCHELL, J. B; Nitric oxide and cancer: an introduction. **Free Radic. Biol. Med.** n.34, p.951–4, 2003.
- WHO. **Control of the leishmaniasis:** report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organ Tech Rep. Ser. p.949, 2010.
- ZAMZAMI, N. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J. Experimen. Med.**, v.183, p.1533–1544, 1996.

## **CAPÍTULO 2**

**Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com a apoptose de células mononucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral**

**RESUMO** – A leishmaniose visceral é causada por protozoários intracelulares capazes de alterar os mecanismos de defesa dos macrófagos, principalmente os relacionados a NO e ROS, substâncias capazes de matar o parasito *Leishmania* sp.. A HO-1, uma molécula essencial na proteção celular, também pode ser envolvido na regulação da infecção. A produção excessiva desses metabolitos pode ser prejudicial e estar ligada a evolução das lesões e da apoptose, porém seus papéis ainda não estão esclarecidos nos cães. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os níveis de reativos de oxigênio, nitrogênio e atividade HO-1 em células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do esplênico e sua relação com a apoptose. Foram utilizadas células sanguíneas e leucócitos do baço caninos divididos em grupo infectado e saudável. As células foram isoladas e cultivadas durante 24 horas e depois incubadas com sondas para NO ou ROS e a apoptose foi determinada. Todas as análises foram realizadas por citometria de fluxo. No sobrenadante da cultura celular foi avaliada a atividade de HO-1 por meio de teste colorimétrico. Os resultados obtidos indicam que cães infectados tiveram redução do metabolismo oxidativo e aumentou a taxa de apoptose dos leucócitos sanguíneos, por influência do ROS. Os leucócitos do baço de cães infectados mostraram diminuição da produção de ROS e NO e aumento da apoptose celular, mostrando uma correlação negativa entre eles. A atividade da HO-1 foi menor tanto nas células mononucleares como nos leucócitos do baço dos animais infectados, quando comparados às células de animais saudáveis. Entretanto não houve correlação com a apoptose. Concluímos que os mecanismos indutores de apoptose diferem nos sítios de infecção, ou seja, no baço os reativos de oxigênio e nitrogênio estão envolvidos com a inibição do processo de morte celular, no entanto a atividade de HO reduzida pode ter influência na apoptose celular.

**Palavras-chave:** morte celular programada, cão, reativos de oxigênio

## 1 Introdução

Leishmania são protozoários intracelulares que infectam células mononucleares de mamíferos, como o homem, cães e outros animais silvestres. A doença resultante desta infecção, a leishmaniose visceral (LV), afeta 350 milhões de pessoas em cerca de 98 países (WHO, 2013), sendo que mais de 90% dos casos globais de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. O Brasil tem elevada incidência da doença, com cerca de 28.000 casos por ano (Ministério da Saúde, 2006).

Os cães possuem papel importante no ciclo epidemiológico da doença, pois apresentam intenso parasitismo cutâneo e principalmente quando são assintomáticos (DESJEUX, 2004), facilitando a infecção do vetor e conseqüentemente a sua transmissão (ALVAR et al., 2004; MOLINA, 1994). Em cães, a doença é crônica, podendo se apresentar de forma sintomática ou assintomática, sendo 53% dos animais assintomáticos (BRANDONISIO et al., 2002). Quando sintomática é caracterizada por sinais clínicos como perda de apetite, caquexia, enfartamento local ou generalizada dos linfonodos, lesões cutâneas, alopecia ocular, epistaxe, onicogribose, diarreia e pelos achados laboratoriais como a anemia, insuficiência renal, azotemia, hiperglobulinemia (SEMIÃO SANTOS et al., 1995; SOLANO-GALEGO, 2009).

Por ser um parasita intracelular obrigatório, as leishmanias são capazes de alterar os mecanismos de defesa das células fagocitárias, em favor da sua sobrevivência (NADERER; MELONVILLE, 2008). Nos macrófagos caninos infectados ocorre falha no processo de apresentação de antígenos e conseqüentemente diminuição da proliferação das células T (ESCH et al, 2013; PINELLI et al., 1999). Em cães infectados com *L. infantum* foi observado que outros mecanismos de defesa poderiam estar alterados, tais como a produção de óxido nítrico (NO) e reativos de oxigênio (ROS) (HEIDARPOUR et al., 2012).

O óxido nítrico é a molécula responsável pela morte intracelular dos parasitas no homem (LIEW et al., 1999), camundongo (BOGDAN, 2001) e cão (SERARSLAN et al. 2005). Estudos anteriores realizados por Green et al. (1990) e Mauel et al. (1991) mostram que o NO é a principal molécula capaz de matar as promastigotas de macrófagos murinos *in vitro* e Stenger et al. (1996) refere-se a importância do NO ser importante *in vivo*.

Na leishmaniose canina o sucesso da atividade leishmanicida está ligada à produção celular de NO (PANARO et al., 1998), assim como nos humanos (PANARO et al., 1999). O NO quando produzido em concentrações elevadas pelas células de defesa é tóxico aos microrganismos invasores (MOOKERJEE et al., 2006), porém pode estar também associado à imunossupressão nas infecções parasitárias (VIEIRA et al., 2009) ou à indução da apoptose de linfócitos, como já relatado em infecção por tripanossomatídeos (BOGDAN, 2001).

As células monucleares também podem controlar a infecção por parasitas por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são geradas durante a fagocitose em um processo chamado de explosão respiratória (RB) (BRÜNE et al., 2013). Estudos anteriores realizados em camundongos indicam que essas células podem matar as leishmanias pela produção de ROS *in vitro* (GANTT et al., 2001).

Em seres humanos, estudos *in vitro* mostraram que o ROS também pode controlar as promastigotas, contudo essa via não é a principal forma leishmanicida nessa espécie (NOVAIS et al., 2009). Em cães, Britti, et al (2008) e Bildik et al (2004) mostraram a importância do estresse oxidativo na doença visceral pois quanto mais sinais clínicos o cão infectado por *Leishmania infantum* apresentar maior o estresse oxidativo ao qual ele é submetido (HEIDARPOUR et al., 2012).

A produção excessiva de ROS é prejudicial para tecidos adjacentes, estando envolvido na fase inicial ou na progressão de diversas doenças inflamatórias e na apoptose.

Altas taxas de apoptose em linfócitos tem sido observadas nas LV em modelos experimentais (MAUËL et al., 1991), no homem (PANARO et al., 2001) e em cães (LIMA et al., 2012), porém o papel dos reativos de oxigênio e nitrogênio na indução de apoptose celular não foram investigados na doença canina.

Pouco estudada, a heme oxigenase (HO-1) é uma enzima que desempenha várias funções no organismo, estando principalmente ligada a manutenção da célula, regulação do metabolismo celular e função do sistema imunológico (PRZECKEK, 2012). Estudos recentes têm demonstrado outras funções da HO-1, como o papel anti-apoptótico e anti-inflamatório, isto devido a sua atividade, que gera como produtos o CO, a biliverdina e o  $Fe^{2+}$  (BROUARD et al., 2000).

Trabalhos avaliando o papel da HO-1 na leishmaniose são escassos, e os existentes foram realizados em humanos e em modelos murinos (EL FADILI et al., 2008; LUZ et al., 2012; PHAM et al., 2005), não existindo até o momento estudos elucidando a participação da enzima na em cães com LV.

O uso de indutor de HO-1 aumenta o crescimento do parasita dentro da célula de defesa humana, evidenciando a ação reguladora na infecção por leishmania (LUZ et al., 2012).

O NO também pode interferir na atividade da enzima HO-1, causando uma proteção celular contra o estresse oxidativo. Além disso, a indução de HO-1 por NO inibe a morte celular por apoptose de hepatócitos através da regulação da homeostase celular de ferro pró-oxidante (KIM et al, 1995).

Assim o objetivo do presente trabalho foi investigar os níveis de reativos de oxigênio, nitrogênio e atividade da heme oxigenase em células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço e sua relação com a apoptose celular.

## **Materiais e métodos**

### **Seleção dos animais**

Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico foram utilizados quinze cães, sem raça definida, adultos de ambos os sexos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba, que possuíam pelo menos três sinais clínicos característicos para leishmaniose e com sorologia positiva para antígeno de *Leishmania* spp. (LIMA et al., 2003). O resultado da sorologia foi confirmado por meio de PCR em tempo real de amostras esplênicas (PEROSSO et al, 2014). Os cães foram classificados no estágio moderado da doença, segundo estadiamento propostos pelo *LeishVet Consensus* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O grupo controle foi composto por dez cães sem raça definida, machos e fêmeas, selecionados no município de Araçatuba, com hemograma normal e com sorologia negativa para antígeno de *Leishmania* spp. A negatividade desses cães foi confirmada com PCR em tempo real de amostras esplênicas colhidas no momento da castração dos animais. O experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos no uso de animais em pesquisa e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMVA (Protocolo FOA-00532-2013).

### **Isolamento, cultura, marcação e determinação das taxas de NO, ROS e apoptose.**

As células mononucleares do sangue periférico de cães controle e cães com LV, foram isoladas através de gradiente Histopaque® 1077 e 1119 (Sigma®, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Após o isolamento, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 (Sigma®, EUA) suplementado e mantidas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> (Revco®, EUA). Os leucócitos totais do baço foram obtidos por meio de fragmento de 2cm<sup>2</sup> que foi macerado e adicionado a 10 ml de meio RPMI 1640 suplementado. Após centrifugação retirou-se os “debris” celulares (BD Falcon™ Cell strainer, EUA) e a suspensão foi adicionado 5 ml de tampão de lise de hemácias contendo 7,46 g/l de cloreto de

amônio ( $\text{NH}_4\text{ClO}_3$ ) a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos, centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos e lavadas com solução salina tamponada com fosfato em pH 7,2 por três vezes.

As células obtidas foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços (Corning, NY, EUA) a  $2 \times 10^6$  células/poço em um volume total de 300  $\mu\text{l}$ . As células foram cultivadas na presença de indutor de NO e ROS, 5  $\mu\text{M}$  de PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (SISTO et. al 2001). Após 24h de incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , as células foram marcadas para avaliação da produção de NO, ROS e apoptose por citometria de fluxo.

Para a determinação de NO, as células mononucleares de sangue periférico e leucócitos esplênicos foram coradas com DAF-2DA (2 $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos em incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , a fluorescência foi quantificada no citômetro de fluxo. A produção de ROS foi determinada após incubação das células com H<sub>2</sub>DCFDA 10 $\mu\text{M}$  (Sondas Moleculares Invitrogen-Leiden, Países Baixos), por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , seguindo as recomendações do fabricante.

A determinação da apoptose foi realizada usando o kit Guava Nexin (Millipore®), composto por Anexina V e pelo 7-AAD, de acordo com as instruções do fabricante. Foram analisados 30.000 células excluindo-se os ‘*debris*’ celulares. A análise de citometria foi realizada utilizando-se o BD Accuri C6 software, *version* 1,0.264 (BD Biosciences, CA).

### **Produção de NO e ROS por monucleares e leucócitos do baço de cães do grupo controle e infectado**

Para a análise da produção de NO e ROS no citômetro de fluxo foi utilizada a seguinte protocolo: as células mononucleares do sangue e os leucócitos do baço foram separados dos “*debris*” celulares realizando-se uma “*gate*”, as células da “*gate*” foram analisadas quanto a sua fluorescência e após comparadas com células controle não marcadas.

A avaliação da apoptose foi feita por meio da separação das células monucleares e dos leucócito do baço dos “*debris*”, por uma “*gate*”. Essas células então foram analisadas quanto a fluorescência em FL1, sendo as fluorescentes analisadas em FL2 e FL3, para determinação da apoptose.

### **Atividade da enzima HO-1 em células monucleares sanguíneas e leucócitos de baço**

Uma alíquota da cultura celular foi lisada por ultrassom (Ultra Turrax T25; 2 x 30s) em gelo e centrifugada por 20 min a 15000g a 4 °C, na sequencia sendo deste retirado 150µl de sobrenadante que foi adicionado a mistura dos seguintes compostos, num volume final de 1,5 ml: 2 mM de glicose - 6 - fosfato, 0,14 U/ml de desidrogenase de glicose - 6 - fosfato, 15µM hemina, 1µl biliverdina redutase, 2mM de MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Para iniciar a reação 100 µl de adenina dinucleotídeo fosfato β-nicotinamida (β - NADPH, 150mM) foi adicionado às amostras que depois foram incubadas ao abrigo da luz a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida colocando as amostras em gelo. Uma solução de bilirrubina foi utilizada como padrão (58,47 ng/ml; 10,0 µM), sendo a bilirrubina formada calculada a partir da diferença entre densidades ópticas obtidas no filtro 464 e 530 nm. O teor de proteína foi determinado pelo ensaio espectrofotométrico (Bio – Rad Ensaio de Proteínas). Uma unidade de atividade HO-1 foi definido como a quantidade de bilirrubina (nmol) produzida por hora por mg de proteína (POSÁ et al., 2013).

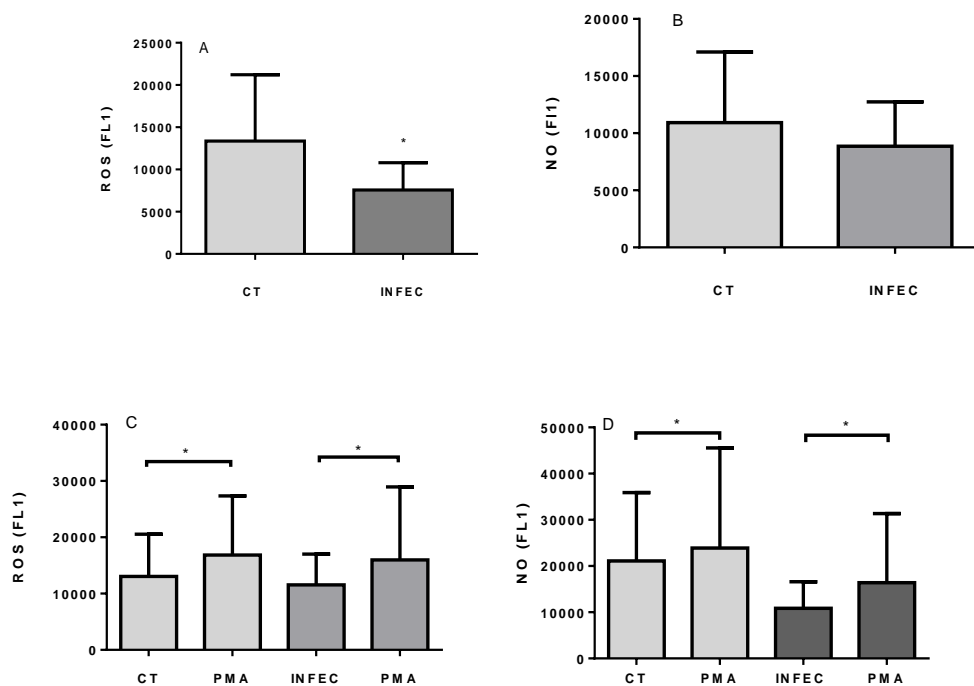
### **Análise estatística**

Os resultados obtidos nas diferentes etapas foram analisados utilizando-se testes não paramétricos, como Mann-Whitney, por meio do programa computacional GraphPadPrism 3 (GraphPad Software, Inc. CA. USA). Os resultados foram considerados como significativos quando p<0,05.

## Resultados

### Produção de NO, ROS e atividade da Heme Oxigenase

O metabolismo oxidativo foi menor nas células mononucleadas do sangue periférico de cães com LV em comparação com cães saudáveis do grupo controle (Figura 3A). Os níveis de NO nas células não diferiram significativamente entre os dois grupos (Figura 3B). A estimulação celular com PMA aumentou a produção de ROS e NO nos grupos estudados (Figura 3C e D). Quanto a atividade da enzima HO ocorreu a diminuição nos cães infectados (Figura 3E).



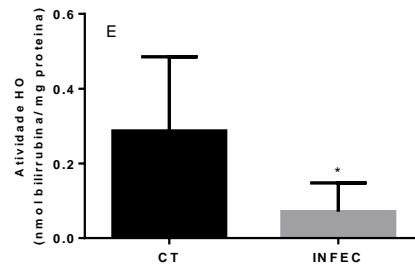
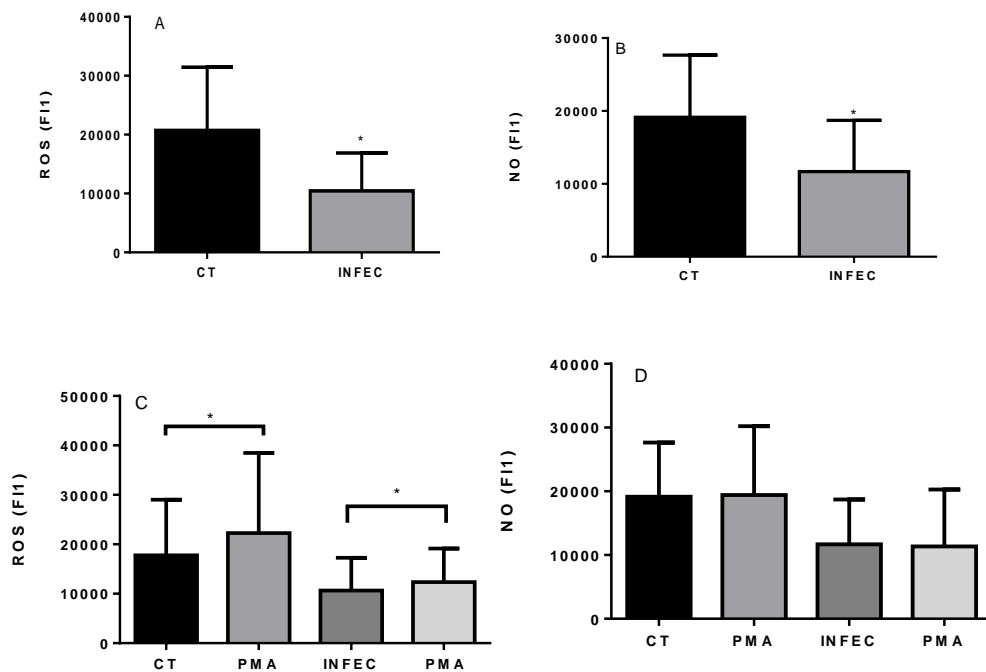


FIGURA 3 - Níveis de ROS (A) e NO (B) em mononucleares de sangue periférico cães saudáveis e naturalmente infectados; Níveis de ROS e NO sem estímulo e após o estímulo com PMA (C e D). Atividade da enzima HO nos cães saudáveis e naturalmente infectados (E). Dados gráficos apresentados com média e desvio padrão; \* $p < 0,05$ . Teste de Mann Whitney.

Observamos menor metabolismo oxidativo e a produção de NO foi menor nos leucócitos do baço de cães com LV apresentaram em comparação com as células de cães controle do grupo controle (Figura 4A e 4B). A estimulação celular com PMA aumentou a produção de ROS, porem nenhuma diferença na produção NO foi observada nos grupos estudados (Figura 4C e 4D). A atividade da enzima HO-1 foi menor nos leucócitos de cães infectados (Figura 4E).



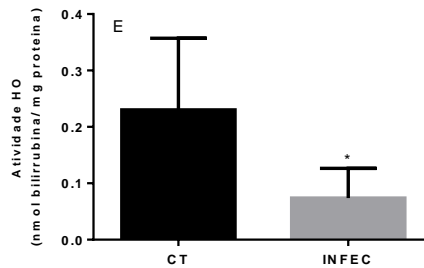


FIGURA 4- Níveis de ROS (A) e NO (B) em leucócitos de baço cães saudáveis e naturalmente infectados; Níveis de ROS e NO sem estímulo e após o estímulo com PMA (C e D). Atividade da enzima HO em cães saudáveis e infectados (E). Dados gráficos apresentados com média e desvio padrão; \*p < 0,05. Teste de Mann Whitney.

### **Taxa de apoptose de mononucleares de cães do grupo controle e infectados e sua relação com a HO.**

Estudos anteriores indicaram que ROS e NO podem ser indutores de apoptose (BOGDAN, 2001), assim avaliamos se a infecção crônica por *Leishmania* spp. em cães induzia apoptose de células mononucleares sanguíneas e leucócitos do baço, e se ROS e NO estavam envolvidos como indutores de apoptose.

As células mononucleares do sangue periférico dos cães naturalmente infectados apresentaram uma maior taxa de apoptose (Figura 5). A análise de correlação entre a produção de ROS e apoptose mostrou correlação positiva  $r=0,5160$   $p<0,05$  (teste de correlação de Spearman).

A análise da atividade de HO-1 não mostrou correlação com as taxas de apoptose das células mononucleares de sangue periférico (dados não mostrados).

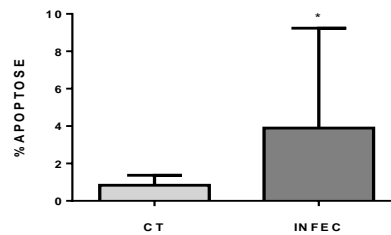


FIGURA 5 - Taxa de apoptose dos monucleares de sanguíneos; Dados gráficos apresentados com média e desvio padrão; \* $p < 0,05$ . Teste de Mann Whitney.

Os leucócitos do baço de cães naturalmente infectados apresentaram maior taxa de apoptose quando comparados ao grupo controle (Fig 6), A análise de correlação entre a produção de ROS e apoptose mostrou correlação negativa  $r = -0,5176$   $p < 0.05$  (teste de correlação de Spearman), resultados similares foram observados entre a correlação da produção de NO e apoptose  $r = -0,1844$   $p < 0.05$  (teste de correlação de Spearman).

A análise da atividade de HO-1 não mostrou correlação com as taxas de apoptose das células leucocitárias do baço (dados não mostrados).

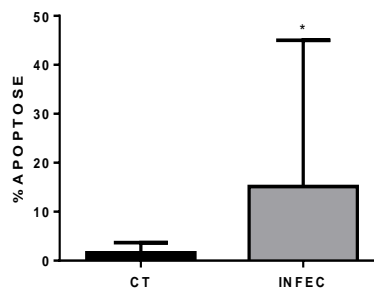


FIGURA 6 - Taxa de apoptose dos leucócitos do baço Dados gráficos apresentados com média e desvio padrão; \* $p < 0,05$ . Teste de Mann Whitney.

## Discussão

Neste estudo foram utilizadas células mononucleares de cães saudáveis e naturalmente infectados com *Leishmania* para a aferição da produção das taxas de NO, ROS, atividade heme-oxigenase e sua relação com a apoptose. Nossos resultados mostraram que a leishmaniose nos cães reduziu o metabolismo oxidativo no monucleares de sangue e leucócitos de baço.

Também houve diminuição da produção de NO no baço e aumento da taxa de apoptose das células mononucleares sanguíneas e de leucócitos do baço. Foi observada a correlação positiva entre a produção de ROS e a apoptose nos mononucleares do sangue periférico. A produção de ROS dos leucócitos do baço de cães infectados mostraram correlação negativa com a apoptose celular.

Neste estudo foi possível observar que a leishmaniose ocasionou uma diminuição na produção de NO, confirmando que os parasitas podem inibir a produção de NO intracelular, aumentando assim seu tempo de vida no interior do hospedeiro (DIAZ et al., 2012). Em humanos também é observada a inibição da produção de NO, o que favoreceu o crescimento das leishmanias nas células fagocíticas (NOVAIS et al., 2014). Na LVC, o óxido nítrico tem um importante papel leishmanicida e leishmaniostático, auxiliando no controle da progressão da doença (LIEW et al., 1990; ROMÃO et al., 2007). E este metabólito se encontra mais elevado na fase aguda de doenças como tripanossomíase (BOGDAN, 2001), aterosclerose (KATSURA et al., 1994), lesão de reperfusão do tecido (PARK; LUCCHESI, 1999), confirmando que nossos cães positivos se encontravam na fase crônica da leishmaniose, como evidenciado pelo estadiamento clínico proposto.

Nos cães, os níveis de NO em infecções parasitárias pode variar conforme a intensidade do parasitismo e sofrer influência de fatores nutricionais que afetam a imunidade (SANTOS et al., 2011; SANCHES et al., 2014). Os valores obtidos podem ter sofrido a interferência do estado nutricional, afetando a imunidade ou mesmo da carga parasitária dos cães, já que a condição a qual estavam expostos não era a ideal. A reduzida produção de NO observada nos mononucleares de sangue periférico e leucócitos de baço dos cães infectados é semelhante ao observado em mononucleares de sangue periférico de pacientes com LV (SAKAR et al., 2011), sugerindo que o cão pode ser um modelo útil para investigar a imunidade na leishmaniose visceral humana.

O NO produzido por macrófagos está fortemente envolvido com a apresentação clínica da leishmaniose nos cães, sendo que com a evolução da

doença a produção deste metabólito diminui consideravelmente (PANARO et al., 2008). Animais do grupo infectado apresentavam sinais clássicos da doença, tais como a onicogribose e a linfadenopatia associados a baixos níveis de NO.

Observamos uma diminuição da produção de ROS nos cães infectados. Na patogênese de doenças infecciosas, os níveis de ROS parecem se correlacionar à fase da doença (BILDIK et al., 2004; EREL et al, 1997), sendo observado aumento da produção de superóxido nas fases iniciais seguido de uma ligeira diminuição (GÓMEZ-OCHOA et al. 2010) como observado em nosso estudo pois os cães estavam na fase crônica da leishmaniose visceral.

Quando o PMA foi utilizado como estímulo das células sanguíneas, foi possível detectar que tanto as células dos animais infectados como as dos saudáveis produziram quantidades significantes de NO, que poderiam auxiliar no controle da carga parasitária, sugerindo que a maquinaria celular envolvida na transdução de sinal está preservada. Contudo, em leucócitos do baço não foi observado diferença significativa na produção de NO após o estímulo, evidenciando uma falha intrínseca na sinalização celular associada a produção de NO. Esta falha poderia estar relacionada à deficiente resposta imunológica gerada devido à alta carga parasitária esplênica já reportada em outros estudos (REIS et al., 2009), e a alta produção de IL-10 observado no baço dos cães com LV que pode inibir a expressão de iNOS, enzima responsável pela formação de NO (NOVAIS et al, 2014).

O reduzido metabolismo oxidativo observado nas células mononucleares do sangue e leucócitos do baço do grupo infectado indica que a infecção por *Leishmania* spp. é capaz inibir o metabolismo oxidativo, pois a presença de superóxido dismutase no parasita favorece a sua propagação e o estabelecimento da doença (LANGONI et al., 2013). Similar a nossos achados, a inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos foi observada em cães infectados quando estimulados com zimosan (BRANDONISIO et al.,1996; VUOTTO et al., 2000) e PMA (VUOTTO et al., 2000),

A regulação da resposta imunológica está intimamente ligada à apoptose celular, sendo uma importante forma de resposta a diversas infecções (ROJAS et al, 1999). Em nosso estudo observamos que a porcentagem de células apoptóticas no sangue periférico e leucócitos do baço foram maiores nos grupos infectados quando comparada ao grupo controle, similar ao referida por Lima et al. (2012) que observou aumento da apoptose em linfócitos T de sangue e baço de cães portadores LV. O aumento de FAS / FAS-L em células CD4 e CD8 do sangue e baço de cães com LV tem sido associado ao mecanismo indutor de apoptose, porém o bloqueio funcional desses receptores não inibiu a apoptose por completo, sugerindo que outras vias possam atuar (SILVA et al., 2013).

Observamos correlação positiva entre a apoptose das células mononucleares de sangue periférico e a produção de ROS no sangue. De fato a produção prolongada de ROS pode causar danos a membrana levando a apoptose (ZAMZAMI et al., 1996), sugerindo que parte da apoptose celular nas células mononucleares de sangue periférico são decorrentes da produção continua desse metabólito. Já no baço, a correlação negativa entre a apoptose e a produção de ROS, sugere que esta molécula esteja atuando como citoprotetora, diferenças na sua concentração promovem a interação entre as moléculas NF-kappa B e JNK, levando tanto a apoptose como a citoproteção. A citoproteção pode ser decorrente da indução de TNF gerado pela produção ROS, devido a ativação do fator de transcrição NF-kappa B (SIMON et al., 2000).

A correlação negativa observada entre a produção de NO e apoptose sugere que NO atua como uma molécula antiapopótica na LCV, protegendo os leucócitos do baço. A função antiapopótica do NO já foi observada em infecções bacterianas, virais e parasitárias (BRÜNE et al, 1998), após a indução de estresse oxidativo (KIM et al., 1995), anoxia (MADESH et al., 1999), na inibição da regressão de tumores (KOLB, 2000) e em outros tipos celulares, tais como leucócitos, células B humana (MANNICK et al., 1994), hepatócitos (KIM et al., 1997; SAAVEDRA et al., 1997), esplenócitos (GENARO et al.,

1995), condrócitos, células mesangiais, neurônios (BRÜNE et al., 1998) sendo dependente apenas da concentração e via de indução na célula (KOLB, 2000). A ação antiapoptótica pode inibir as caspases em células que fazem a nitrosilação e a via dependente de c-GMP (MANNICK,1997), futuros estudos serão necessários para estabelecer a via pelo qual o NO está exercendo o seu papel antiapoptótico na LVC.

O efeito anti-apoptótico do NO se relacionar a manutenção de células linfoides ativadas gerando uma desregulação da resposta imunológica que pode envolver clones T específicos ou não, que promovem autominunidade já relatada na LVC (GINEL et al. 2008).

A baixa atividade da HO-1 nas células mononucleares de sangue periférico dos cães com LV a apoptose associada ao ROS nas células mononucleares de sangue periférico pode ser decorrente da baixa atividade da enzima HO-1, pois sua atividade está associada com a redução da imunopatologia ligada ao estresse oxidativo (PAE, 2009; RYTER et al., 2000)

A diminuição da atividade HO-1 nos leucócitos do baço, principal órgão de multiplicação de parasitas, não tem sido estudada na leishmaniose visceral, *in vitro* a infecção de macrófagos humanos promove o aumento dos níveis da proteína HO-1 (LUZ et al., 2012), porém o aumento da proteína não necessariamente está relacionado ao aumento da sua atividade.

Devido à baixa atividade da enzima HO-1 observada é possível que o efeito antiapoptótico exercido pela HO-1 (GOZELLINO et al., 2010) tenha sido prejudicado, ocasionando o aumento da apoptose das células mononucleares do sangue periférico e do baço.

Concluimos que os mecanismos indutores de apoptose e a capacidade de transdução de sinal celular diferem nos sítios de infecção. No baço os reativos de oxigênio e nitrogênio estão envolvidos com a inibição do processo de morte celular. A baixa atividade de hemooxigenase-1 pode ter influência na apoptose celular, futuros estudos descrevendo as vias de interação desses metabólitos serão importantes para esclarecer a patogênese na leishmaniose visceral canina.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa e por conceder a bolsa de mestrado (Processo 2014/08931-6).

## Referências

- ALVAR J. et al. Canine Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.** n.57, p. 1-88. 2004.
- BILDIK, A. et al. Oxidative stress and nonenzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Reser. of Vet. Sci.** n. 77, p. 63–66. 2004.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature**, n. 2, p.907-916, 2001.
- BRANDONISIO, O. et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin. and exper. Med.** n.2, p.125–129, 2002.
- BRANDONISIO, O. et al. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Vet. Immunol. and Immunopat.** n. 53, p.95–103, 1996.
- BRITTI D. et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Vet. Res. Commun.** n.32, p.251–254. 2008.
- BROUARD, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. and Soares, M. P. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **J. Exp. Med.** n.192, p.1015–1026, 2000.
- BRÜNE, B. et al. Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxid. Redox Signal** n.19, p.595–637. 2013.
- BRÜNE, B.; von Knethen, A.; Sandau, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.** n.351, p.261-272,1998.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 27, p.305-318, 2004.

- DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Vet. Parasitol.** n.26, p.137-144, 2012.
- EL FADILI, K. et al. Antimicrobial agents and chemotherapy, v.18, p.4866-4874. 2008.
- EREL, O.; Kocygit, A.; Aktepe, N.; Avci, S.; Leukocyte adenosine deaminase, superoxide dismutase activities and lipid peroxidation in cutaneous Leishmaniasis. **Acta Paras. Turcica.** n.21, p.160–161, 1997.
- ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The J. of Immunol.** p.5542-5550, 2013.
- Gantt, K. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol.** n.167, p.893–901, 2001.
- Genaro, A. M. et al. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. **J. Clin. Invest.** n.95, p.1884-1890, 1995.
- GINEL, P. J.; CAMACHO, S.; LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Res Vet Sci.** n.85, p.510–514, 2008.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, n.144, p.278–283, 1990.
- GRIMALDI, J. R.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** n.6, p.230–250, 1993.
- GOMEZ-OCHOA, P. et al. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** n.172, p.135–138, 2010.
- HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitol. Res.** n.111, p.1491–1496, 2012.
- KATSURA, M.; FORSTER, L. A.; FERNS, G. A. A.; ANGGARD, E. E. Oxidative modification of low-density lipoprotein by human polymorphonuclear leucocytes

- to a form recognised by the lipoprotein scavenger pathway. **Bioch. et Biophys. Acta**, n.1213, p. 231–237, 1994.
- KIM, Y. M.; TALANIAN, R. V.; BILLIAR, T. R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. **J. Biol. Chem.** n.272, p.31138-31148, 1997.
- KIM, Y. M. et al. Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis. **J. Biol. Chem.** n.270, p.5710-5713, 1995.
- KOLB, J. P. Mechanisms involved in the pro- and antiapoptotic role of NO in human leukemia. **Leukemia** n.14, p.1685-1694, 2000.
- LANGONI, S. S.; SANCHEZ-MORENO, M.; LOPEZ, J. E. R.; MARIN, C. *Leishmania infantum* secreted iron superoxide dismutase purification and its application to the diagnosis of canine Leishmaniasis. **Comp. immunol. Microbiol. and Infect. Dis.** n.36, p.499-506, 2013.
- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunol.** n. 71, p.556–559, 1990.
- Lima, V. M. F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.** n.184, p.147-153, 2012.
- Lima, V. M. F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n.36, p. 485-489, 2003.
- LUZ, N. F. et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J. Immunol.**, n.188, v.9, p.4460-7, 2012.
- MADESH, M.; RAMACHANDRAN, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Nitric oxide prevents anoxia-induced apoptosis in colonic HT29 cells. **Arch. Biochem. Biophys.** n.366, p.240-248, 1999.
- MANNICK, J. B. et al. Nitric oxide produced by human B-lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. **Cel.** n.179, p.1137-1146, 1994.
- MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-

dependent process that produces nitrogen derivatives. **J Leuk Biol**, n. 49, p.73-82, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, 120, 2006.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** n.88, p.491-493, 1994.

MOOKERJEE, B. J. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani* infected macrophages. **Antimicrob. Agents. Chemother.** n.50, p.1788–1797, 2006.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. () The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cell. Microbiol.** n.10, p.301–308, 2008.

NOVAIS, F. O. et al. Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species. **The J. of Infect. Dis.** n.209, p.1288–96, 2014.

NOVAIS, O. F. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The J. of Immunol.** n.183, p.8088-8098, 2009.

PAE, H. O.; CHUNG, H. T. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. **Immune Network** n.9, p.12–19, 2009.

PANARO, M. A. et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? **Parasit. Vectors**, n.1, p.1-10, 2008.

PANARO, M. A. et al. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin. Exp. Med.**, n.1, p.137-143, 2001.

PANARO, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with

- interferon- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. **Int. J. Clin. Lab. Res.** n. 29, p.122–127, 1999.
- PANARO, M. A. et al. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. **Immunophar. Immunotoxicol.** n.20, p.147–158, 1998.
- PARK, J. L.; LUCCHESI, B. R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. **Annals of Thoracic Surgery.** n.68, p.1905-1912, 1999.
- PEROSSO J. et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** n.205, p.417–423, 2014.
- PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infect. Immun.** n.12, p.8322-33, 2005.
- PINELLI, E. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, n.67, p.237-43, 1999.
- ROJAS M. et al. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **J. Immunol.** n.162, p.6122, 1999.
- ROMÃO, P. R. T. et al. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de pesquisa e extensão em saúde- UNESC*, 3. 2007.
- RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic. Biol. Med.** n.28, p.289–309, 2000.
- Saavedra, J. E. et al. Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. **J. Med. Chem.** n.40, p.1947- 1954, 1997.

- SARKAR A. et al. Chatterjee M Monitoring of Intracellular Nitric Oxide in Leishmaniasis: Its Applicability in Patients with Visceral Leishmaniasis. **Cytometry Part. v.79A**, p.35-45, 2011.
- SANCHES, F. P. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Vet. Scand.** n.56, p.57, 2014.
- SANTOS, F. R. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Res.** n.108, p.1397–1403, 2011.
- SEMIÃO-SANTOS et al. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitol. Res.** n.81, p.235-239, 1995.
- SERARSLAN, G.; YILMAZ, H. R.; SOGUT, S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.** n.30, p.267–271, 2005.
- SILVA, K. L. et al. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.** n.197, p.470-476, 2013.
- SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis** n.5, p.415-418, 2000.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** n.28, p.1-18, 2009.
- STENGER, S. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.** n.183, p.1501, 1996.
- VIEIRA, P. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute stage of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. **Exp. Parasitol.** n.121, p.76–82, 2009.
- VUOTTO, M. L. et al. Chemiluminescence activity in whole blood phagocytes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Luminescence** n.15, p.251–255, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Technical Report Series 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva, Switzerland, p. 86, 2013.

ZAMZAMI, N. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine** n.183, p.1533–1544, 1996.